

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-300273

(43)Date of publication of application : 31.10.2000

(51)Int.Cl.

C12N 15/09

A01H 1/00

A01H 1/06

C12N 5/10

// (C12N 15/09

C12R 1:91)

(21)Application number : 11-115002

(71)Applicant : SAISHU JITSUYO GIJUTSU KENKYUSHO:KK

(22)Date of filing : 22.04.1999

(72)Inventor : ISHIGURO SUMIE
OKADA KIYOTAKA
ODA AKIKO

(54) GENE PARTICIPATING IN DEHISCENCE OF ANTHER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new gene having a specific base sequence, comprising a DNA having promoter activity, controlling anther dehiscence and pollen maturity, and e.g. useful for raising male sterility plants for producing F1 hybrid variety seeds.

SOLUTION: This gene is a new DNA expressed by a base sequence of the formula or a new DNA expressed e.g. by a base sequence where at least one base deletion, substitution or addition has occurred in a base sequence of the formula, having promoter activity and obtained by the site-specific mutagenesis of the DNA expressed by a base sequence of the formula. The gene controls anther dehiscence and pollen maturity, and is used for producing male sterility plants useful for producing F1 hybrid seeds, the fertility restoring of male sterility plants or the like. The DNA is obtained by isolation from a cDNA library of WS-ecotype *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Copyright © 2000 by JPO
Patent Abstracts of Japan
This abstract is a translation of the original
published in Japanese Patent Abstracts, No. 2000-300273

Patent Abstracts of Japan
This abstract is a translation of the original
published in Japanese Patent Abstracts, No. 2000-300273

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

02.12.1999

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

3138452

[Date of registration]

08.12.2000

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

BEST AVAILABLE COPY

[Date of extinction of right]

Japanese Unexamined Patent Publication
No. 300273/2000 (*Tokukai* 2000-300273)

A. Relevance of the Above-identified Document

The following is a partial English translation of exemplary portions of non-English language information that may be relevant to the issue of patentability of the claims of the present application.

B. Translation of the Relevant Passages of the Document

See also the attached English Abstract.

[TECHNICAL FIELD]

The present invention relates to DAD1 (DEFECTIVE IN ANTHR DEHISCENCE 1) gene, and plants in which expression of DAD1 gene is suppressed. The DAD1 gene is a gene that controls dehiscence of anther and maturation of pollen. By suppressing expression of the DAD1 gene, male sterile plants can be produced whose floral organ structure is almost identical to that of the wild type. The fertility of the male sterile plants can be recovered by treatment with jasmonic acid or linolenic acid, so that self-fertilizing seeds can be produced. Therefore, no maintenance line is required and first filial generation plants can be produced.

...

[0006]

[PROBLEMS TO BE SOLVED BY THE INVENTION]

An object of the present invention is to provide a nuclear gene that controls dehiscence of anther and pollen maturation. The invention also provides a technique whereby expression of the nuclear gene is suppressed to control male sterility and male fertility and thereby introduce male sterility for all individuals making up a maternal plant population.

[0007]

[MEANS TO SOLVE THE PROBLEMS]

The inventors of the present invention diligently worked to solve the foregoing problems, and successfully produced, using a T-DNA tagging method, mutants (dad1) of *Arabidopsis thaliana* in which no dehiscence of anther occurs even when the plant forms flowers. The pollens of these mutants had lost the germinating ability and were male sterile. Treating the buds of dad1 mutants with jasmonic acid or linolenic acid caused the anther to dehisce in flowers that were formed after the treatment, with the result that self-fertilizing seeds were formed... Further, it was found that a plant with no anther dehiscence, like the dad1 mutants, could be produced if antisense DAD1 gene, ligated backward to the promoter of DAD1, were incorporated in the genomic DNA of a plant.

[0010]

In the fourth invention, the present invention relates to male sterile plants in which expression of DNA according to the foregoing second invention is suppressed. In the fifth invention, the present invention relates to a method for producing male sterile plants in which expression of DNA according to the foregoing second invention is suppressed. In the sixth invention, the present invention relates to a method for recovering fertility by treating the male sterile plants of the foregoing fourth invention with jasmonic acid, linolenic acid, or derivatives of these acids.

[EMBODIMENTS]

...

[0016]

(4) Fourth Invention

According to the fourth invention, there is provided male sterile plant in which expression of DNA according to the

second invention is suppressed. The type of plant is not particularly limited as long as it includes the DNA according to the second invention. For example, the plant may be *Brassicaceae*, *Poaceae*, *Asteraceae*, or *Chenopodiaceae*.

[0017]

The male sterile plants have the following features. First, the plant has traits almost identical to those of the wild type, except that the anther does not dehisce... The male sterile plants of the present invention have floral organs almost identical to those of the wild type. This helps attract bees, horse flies, and other pollinating insects, with the result that seed production is increased. Another feature of the male sterile plants is that the fertility of the plants can be recovered by treatment with jasmonic acid, linolenic acid. With these features, the male sterile plants of the present invention can easily produce self-fertilizing seeds and provide a homozygous population for male sterile genes...

[0018]

(5) Fifth Invention

According to the fifth invention, there is provided a method for suppressing expression of DNA according to the second invention. The method is not particularly limited. Preferable methods include, for example, the antisense method, cosuppression method, gene disruption tagging method, gene targeting method, and a method employing mutagens, as will be described later.

[0019]

i) Antisense Method

In the antisense method, the expression of DNA according to the second invention is suppressed by constructing a vector that includes a suitable promoter and DNA (antisense DNA) of the third invention placed downstream of the promoter,

and introducing the vector into a plant...

...

[0022]

ii) Cosuppression Method

In this method, a vector is constructed in which a gene of interest is placed downstream of the DNA (promoter) of the first invention, and the vector is introduced into a plant. The expression of DNA according to the second invention is suppressed by the resulting cosuppression...

[0023]

iii) Gene Disruption Tagging Method

In this method, the expression of DNA according to the second invention is suppressed by inserting T-DNA or transposon into the DNA of the second invention. A vector including T-DNA or transposon is introduced into a plant to prepare a group of mutant lines in which the T-DNA or transposon is randomly inserted into the genome. Then, genomic DNA is prepared from the plants of these mutant lines, and individuals with disrupted DAD1 gene are screened for by PCR. Alternatively, individuals with disrupted DAD1 can be selected by screening for mutants with no anther dehiscence, based on the phenotype of the mutated plants, or by treating the buds of the mutants with linolenic acid or jasmonic acid.

...

[0025]

iv) Gene Targeting Method

In this method, the expression of DNA according to the second invention is suppressed by knocking out the DNA of the second invention. This is achieved by inserting DNA into part of the DNA of the second invention by homologous recombination. For example, this can be carried out according to the method described in Kempin et al., Nature 389: 802-803, 1997).

Specifically, kanamycin gene or the like is introduced into the DNA of the second invention to construct a targeting vector, and the vector is introduced into a plant to cause homologous recombination and knock out the DNA of the second invention...

[0026]

v) Method employing Mutagens

In this method, the expression of DNA of the second invention is suppressed by treating a plant with mutagens and causing mutation in the DNA of the second invention. Specifically, plants of interest or their seeds are treated with mutagens, and individuals with disrupted DAD1 gene are screened for from M2 generation that was self-fertilized from the first generation (M1) treated with mutagens. For example, after treating several thousand plant individuals with mutagens, self-fertilizing seeds are collected. For each individual of the M1 generation, several seeds are planted and mutants with no dehiscence of anther are screened for. Then, the buds of the selected mutants are treated with linolenic acid or jasmonic acid to screen for individuals with disrupted DAD1 gene.

[0027]

The mutagen is not particularly limited as long as it can increase the mutation rate. Some of the examples include x-rays, γ-rays, ethyl methanesulfonate (EMS), and N-nitroso-N-methylurea (NMU)...

[0028]

(6) Sixth Invention

According to the sixth invention, there is provided a fertility recovering method in which the male sterile plant of the fourth invention is treated with jasmonic acid, linolenic acid, or derivatives of these acids.

...

[EXAMPLES]

...

[Example 5] Production of Male Sterile Plants (Method using Antisense DAD1 Gene)

(1) Construction of a Vector with Antisense DAD1 Gene

... The promoter region was amplified by PCR... The DAD1 translation region was amplified by PCR. The amplified fragments were inserted into pBluescriptII SK- (Stratagene) to obtain antisense DAD1 gene, in which the DAD1 translation region is ligated backward on the downstream side of the promoter region.

[0040]

The antisense DAD1 gene was then excised from the plasmid vector and inserted at ClaI and SacI sites of binary vector pGAH to construct binary plasmid pADAD1.

[0041]

(2) Transformation of *Arabidopsis thaliana*

The binary plasmid pADAD1 was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 strain, so as to transform *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration...

[0042]

The transformed *Arabidopsis thaliana* did not show dehiscence of anther as in *dad1* (Figure 6, left-hand side), and no self-fertilizing seeds were formed. The unflowered buds of the transformants were soaked with an aqueous solution of 0.5 mM methyl jasmonate. The flowers that were formed after the treatment had dehiscence of anther, exposing pollens on the surface of the anther (Figure 6, right-hand side). When the pistils were pollinated with these pollens, self-fertilizing seeds were formed. It was therefore found that transformants with male sterility, similar to *dad1* mutants, could be produced by introducing the vector described in Example 5-(1).

[0043]

[Example 6] Production of Male Sterile Plants (Method using Promoter-GUS Gene Introduced Vector)

(1) Construction of Promoter-GUS Gene Introduced Vector)

pGDAD1-HS was excised with S_{ph}I, and the blunt ends were smoothed by klenow fragments. Then, the sequence was excised with HindIII to isolate a DNA fragment of 3512 bp. The DNA fragment was then ligated between HindIII and SmaI of the binary vector pBI101.2 (Clontec) to construct plasmid pBIDAD-H (Figure 7), in which GUS reporter gene is ligated to the promoter of DAD1 gene.

[0044]

(2) Transformation of *Arabidopsis thaliana*

pBIDAD1-H was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* GV301 strain to transform *Arabidopsis thaliana* by vacuum infiltration, as in Example 5-(2). There were no phenotypic abnormalities in the majority of the transformed *Arabidopsis thaliana*... In some of the transformants, however, no dehiscence of anther occurred as in the dad1 mutants. The ability to dehisce was recovered by jasmonic acid treatment. The staining ability by X-Gluc was weaker in these individuals.

...

[EFFECTS OF THE INVENTION]

The present invention provides a nuclear gene that controls dehiscence of anther in plants. The invention also provides male sterile plants in which expression of the nuclear gene is suppressed. The male sterile plants have floral organs almost identical to those of the wild type, can recover fertility by treatment with jasmonic acid or the like. The male sterile plants are therefore highly useful for the production of F1 seeds.

(19) 日本国特許庁 (J P) (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-300273
(P2000-300273A)

(43) 公開日 平成12年10月31日 (2000.10.31)

(5) Int. Cl.	識別記号	FI	チーゴード (参考)
C12N 15/09	ZNA	C12N 15/00	ZNAA 2B030
A01H 1/00		A01H 1/00	A 4B024
			4B065
C12N 5/10		C12N 5/00	C
// (C12N 15/09)	ZNA		

審査請求 有 請求項の数 6 OL (全 20 頁) 最終頁に続く

(2) 出願番号	特願平11-115002	(7) 出願人	595017702 株式会社森種実用技術研究所 宮城県仙台市青葉区南五丁目6番地の3 石黒 遼希
(22) 出願日	平成11年4月22日 (1999.4.22)	(72) 発明者	京都府京都市左京区北白川通分町 京都大 学大学院理学研究科生命科学専攻植物学系 岡田 裕孝
		(72) 発明者	京都府京都市左京区北白川通分町 京都大 学大学院理学研究科生命科学専攻植物学系 井理士 平木 祐輔 (外2名)
		(74) 代理人	100091096 井理士 平木 祐輔 (外2名)

最終頁に続く

(54) 発明の名称 薬の製剤に関与する遺伝子

(57) 【要約】

【解決手段】 薬の製剤及び花粉の成熟を抑制する遺伝子、及びその遺伝子の発現が抑制されている遺伝性不妊植物、並びにその遺伝性不妊植物の雄性を回復する方法。
【効果】 その花芽が野生型に限りなく近く、また、ジャスモン酸等により雄性を回復させることのできるため、F1種子生産のために極めて有用な遺伝性不妊植物を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の(a)又は(b)の塩基配列により表され、プロモーター活性を有するDNA。

(a) 配列番号3に記載の塩基配列

(b) 配列番号3に記載の塩基配列において、1若しくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列であるDNA。
【請求項2】 以下の(a)又は(b)のタンパク質をコードするDNA。

(a) 配列番号2に記載のアミノ酸配列により表されるタンパク質
(b) 配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列により表され、薬の製剤を抑制する機能を有するタンパク質

【請求項3】 請求項2記載のDNAと相補的な塩基配列により表されるDNA。

【請求項4】 請求項2記載のDNAの発現が抑制されていることを特徴とする遺伝性不妊植物。

【請求項5】 請求項2記載のDNAの発現を抑制することと特徴とする遺伝性不妊植物の作出方法。

【請求項6】 請求項4記載の遺伝性不妊植物をジャスモン酸、リノレン酸、又はそれらの誘導体で処理することと特徴とする雄性回復方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、DAD1 (DEFECTIVE 1, N ANOTHER DEFICIENCY 1) 遺伝子、及び後述の遺伝子の発現を抑制した植物に関する。DAD1遺伝子は薬の製剤及び花粉の成熟を抑制する遺伝子であり、DAD1遺伝子の発現を抑制することで、野生型に限りなく近い花芽構造を有する遺伝性不妊植物の作出が可能になる。作出された遺伝性不妊植物はジャスモン酸、リノレン酸、リノレン酸処理により雄性を回復し、自殖種子を得ることができ、そのため、維持系統を必要とせず、一代雑種品質育成が可能となる。

【0002】

【従来の技術】 近年、多くの作物で雑種強勢 (ヘテロシス) を利用した一代雑種 (F1) 品種の育成が進められている。このF1品種のメリットは、雑種強勢の発現により収量性、耐病性などの農業形質が優れたものとなること、単因子性による農業形質の伝達が容易なこと、均一性が高いこと、また、次世代で遺伝形質の分離が起こるため育成者の権利が守られることなどが挙げられる。

【0003】 F1品種においては、雑種第1代目の種子を多量に確保する必要がある。そのための技術として、遺伝的雄性不妊性を持つものを母親に使用することが行われてきた。この他に自家不妊性を利用する方法、雄花を人為的に除去する方法、人為的に交配する方法、などがあるが、これらの方法では利用できる植物種が限られている。遺伝的雄性不妊性を利用する方法が、最も汎用性に富んでいるため、F1種子を確保するために広く用いら

れてきた。

【0004】 遺伝的な雄性不妊性には核内遺伝子によって支配される雄性不妊性 (GMS) と核外遺伝子と細胞質因子の両者が関与する細胞質雄性不妊性 (CMS) の2種類がある。F1品種育成の際の母親においては、以下の理由からCMSが利用されてきた。CMSの場合、雄性不妊性を示すのは、その遺伝子についてホモ接合性の個体だけであり、ヘテロ接合性の個体は通常雄性を持つ。幼虫的なF1種子の生産を行うためには、母親に用いる個体すべてが雄性不妊であることが求められるが、このことは、CMSを利用してF1種子を生産する場合には、母親に用いる個体すべてを雄性不妊性に関する遺伝子についてホモ接合性の個体にしなければならぬことを意味する。しかし、CMSにおいては、それ自身の花粉が利用できるもので、自殖によるホモ接合性の個体を作り維持出来ない。ヘテロ接合性の個体自身を交配することにより、ホモ接合性の個体を生産することはできるが、この場合にはホモ接合性個体が1/4しか得られず、実用化できない。

【0005】 しかし、CMSにおいても、その遺伝子に関してホモ接合性の集団が得られる技術が開発されれば、これを利用してF1種子の生産も可能になる。実際、雄性不妊性のホモ接合性の個体を選択する方法などが考案され、一部では利用されているが、ホモ接合性の集団を育成する方法がなかった。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 本発明の目的は、薬の製剤と花粉の成熟を抑制する後述の遺伝子を提供すると共に、その遺伝子発現を抑制することによって、雄性不妊性と雄性可妊性を制御して、母親に使用する植物集団の個体全てが雄性不妊性となる技術を提供することである。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者は、上記の課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、rDNAタギング法により、開花後も花粉の製剤が起らないシロイタナズナ (Arabidopsis thaliana) の突然変異体 (dad1) の作出に成功した。この変異体の花粉は、発芽能力を失っており、雄性不妊性であった。dad1突然変異体の雄配子ジャスモン酸あるいはリノレン酸で処理すると、その後開花した花では花粉の製剤が見られ、自殖種子を形成した。このdad1突然変異体より、rDNA配列をもとにして、DAD1遺伝子のゲノミッククローンとcDNAクローンを単離した。単離したゲノミッククローンを植物導入ベクターに連結して、dad1変異体に形質転換したところ、再生植物体では花粉の製剤、自殖種子の形成が見られ、野生型表現型に回復していた。この結果は、単離した遺伝子がDAD1遺伝子であることを示すものである。さらに、DAD1のプロモーターに逆向きに連結したアンチセンスDAD1遺伝子を植物ゲノムDNA中に組み込むことによって、dad1突然変異体と同様に、薬の製剤の起らない植物体を作成できるこ

選抜することができる。

【0027】用い、突然変異誘発源は、突然変異率を高める誘発源としてよく用いられるものであれば特に限定されないが、例えば、X線およびγ線、メタンスルホン酸エチル(MSE)、OS、ニトロソU-ネー、メタンスルホン酸エチル(MSE)を使用することができ、上記の(III)、(iv)、(v)の方法により遺伝不変させた植物は、第二発明のDNAを正常に発現する植物との交配により次代(F₁)で発性を回復する。F₁雄雄の精子を雌植物として利用する植物の例では、有性生殖、オオムギ、コムギ一般作物のF₁葉緑には、如次である。

【0028】(6)第六發明

第六の異明の粘性回復方法は、上記第四の異明の粘性不発植物をジャスモン酸、リノレン酸、又はそれらの精練体で処理することを特徴とするものである。ジャスモン酸及びリノレン酸の精練体としては、例えば、ジャスモンメチル、リノレン酸ナトリウム、12-オキソ・フィトレン酸、クロナチン等を挙げることができるが、これらに限定されるわけではない。

【0029】処理方法としては、暫をジャスモン酸等を含む溶液に浸漬する方法を例示することができ、これ以外にも例えば、霧、スプレーなどを使用し処理してもよい。ジャスモン酸等を含む溶液の濃度は浸漬時合、特に限定されないが、ジャスモン酸メチルの場合は、0.05~0.5wt%の溶液に数時間浸漬するのが好ましい。

[0030]

【実施例】以下、本発明について実施例を挙げて詳細に説明するが、この実施例は、本発明の範囲を限定するものではない。

「事旗例」] dad1変異体の作出

(1) シロイタナズナ・ザンムDNAへの T-DNA の挿入
T-DNA タグを付加するため、タギングベクター-pB1H1-G
(名古屋大学・中村研)を授けよう供と、エラグロ
バクテリアを用いて、シロイタナズナを導入した。シロ
イタナズナへの遺伝子導入はモデル植物の実験プロトコ
ール(集油社 p99-104)に従い、以下のように行った。
シロイタナズナ (US 農業大学、京都大学大学院理学研
究科 植物学教室) の芽生えから、胚軸部分を切り取り、
2.4-ジクロロフロフェノキシ乙酸 (10.5mg/L) とカイネチン
(0.05mg/L) を含む 1/8 培地で培養し、胚軸の切り口にカ
ルスを形成した。このカルスを、pB1H1-G を含むアグロ
バクテリア EHA101 株を感染させ、pB1H1-G の T-DNA
をカルス細胞のザンムに導入した。

【0031】(2) 形質転染シロイヌナズナ植物体の再生

酢酸)上で選抜しながらシュートを誘導した。シュートを切り取り、0.02mg/インドール酸を含むR16株地に移し、発根を誘導した。このようにしてできた再生植物体(71世代)をバーミキュライトに植えかえ、蛍光灯下で栽培した。自家受粉によって種子(72世代)を形成させ、採種した。

【0032】[実施例2] dad1変異体の同定と解析

(1) dacl1突然変異体の同定
F2世代の種子をパー・ミキュライトに播種し、蛍光灯下で栽培した。開花後も約が開閉しない個体を見いだす。dacl1と命名した(図2)。dacl1個体の花の雄しべに非形質転換体シロイヌナズナ(MS-G2タイプ)の花粉を1回目戻し交配を行い、F1種子を得た。育成した植物の表現型は野生型であり、dacl1突然変異体は劣性突然変異であることが分かった。F1植物から自殖種子(F2)を採集した後、F2植物集団の中から得たdacl1変異体に耐し、同様の方法で2回目の戻し交配を行い、F3種子を得た。以下、F2集団の中からdacl1表現型を示す個体を選び、以下の解析に用いた。

【0033】(2) リノレン酸およびジャズモン酸による変異の回復

【0034】[実施例3] DAD1遺伝子のクローニング

産
dad1 突然変異体から調製したゲノミク DNA を EcoRI で切
断し、T4リガーゼで環状化した。ゲノム中に挿入されて
いる、T-DNA (バイナリベクター-p81H1-G 由来の T-D
NA) のレフトボーダー配列に対する2箇のプライマー HP
H-R (5'-TTTGCCCTCGGAGAGTGT-3') および L6 (5'-CAG
CACATCCCCCTTGCACG-3') を用いてPCRを行い、T-DNA
のレフトボーダーに隣接した遺伝子 40 の一部 (0.5 kb の
DNA断片) を単離した。

【0035】(2) ゲノミックローンの単離

(1) で単離したDNA断片（遺伝子 Aの一部）を33pで標識したクロープに用い、lambda DASH II (Stratagene社) をベクターに用いて作製したシロイヌナズナ (WSエコタイプ) のゲノミックライブラリをスクリーニングし、遺伝子 Aを含むゲノミッククローン lambda 2-1a-1を単離した(図)。

【0036】(3) ゲノミックローンのアラスミドへのサブクロニングと塩基配列の決定 (図3)

をそれぞれアラブスミスベクター *pBluescript SK⁺* (*Stratagene*社) につなぎ、遺伝子 A の 5' 側部分のサブクローニング *pKX3.9* と *pKX3.9* と *pKX3.9* のサブクローニング *pKX3.9* を作成した。次に *pKX3.9* を *HindIII* と *EcoRI* で切断して得た断片と *pKX3.8* を *EcoRI* と *SplI* で切断して得た断片とを連結してアラブスミスベクター *pBluescript SK⁺* (*Stratagene*社) につなぎ、遺伝子 A の *HindIII* から *SplI* までの領域をアラブスミスミッド上に再構築した。このアラブスミッドを *pEAD1-HS* と名付けた。このアラブスミッドを用いて、遺伝子 A の *HindIII* から *SplI* までの領域の塩基配列を決定した。なお、遺伝子 A を含むアラブスミッド *pEAD1-HS* は、大腸菌に導入された状態で工業技術院生命工学工業技術研究所 (平成13年3月12日)。(寄託日: 受託番号ERN-9-17299)として寄託されている。

【0037】(4) cDNAクローンの単離と塩基配列の決定

lambda 2-1a-1 を SpeI で切断して得られる3.6 kbの DNA断片をp2p で標識してアプローブに用い、lambda Zap I (Stratagene 社) をベクターに用いて作製したシロリヌナズン (Ler エコタイプ) の花芽の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、遺伝子 A2 の cDNA クローン lamb 5a3 を単離した。その塩基配列解析したところ、このクローンは3' 側を欠いていることが明らかになったので、プライマー-DMDI-EP3 (5'-CTCTTGAGACCAAGGCGAG-3') を用いて3'-RACE法を行い、欠けている部分を単離した。得られた全長のcDNA クローンは、448 アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含んでいた。ゲノミッククローンの塩基配列とcDNA クローンの塩基配列の比較より、遺伝子A2 はイントロンを含まないことが明らかになった。また、cDNA クローンのオープンリーディングフレームはゲノミッククローンのオープンリーディングフレームより3bp 長く、コードするタンパク質のN末端付近に余分に1アミノ酸残基が挿入されていることがわかったが、この差の違いがそれによって由来するLer とWSのエコタイプの間に起因するものであり、コードするタンパク質の活性には関係がないと推定した。

【0038】実施例4 相補性実験 (遺伝子 A が D AD1 遺伝子であることの確認)

pCDAD1-HIS を SpeI で切断し、切り出した 3551 bp の DNA断片 (配列番号 1 の一部) を pB101 由来のバイナリベクター pAR5-HIS (明治製菓 (株) より供与されたプラスミド pAR5-HIS を一部改変) の SmaI 部位に連結して、バイナリベクター pADAD1-SS (図 4) を作製した。このプラスミドを *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (pGV2260) 株に導入した。リノレン酸処理によって得た dad1 突然変異体の自殖種子から表株例 1 (1-1) と同様の方法でカルルスを調製し、pCDAD1-SS を含む上記 DNA断片を挿入した。T-DNA を感染させて、遺伝子 A を含む SpeI 断片を抽出した。

(2) 同様の方法で接生し、再生植物体を形成させ、この再生植物体を土に移して栽培し、開花させたところ、葯の裂開と、自殖種子の形成が見られ、野生型表型に回復していることが確認できた。この結果より、最終的に選定した D041 遺伝子であると同意定した。

【0039】 雄性不稔植物の作出（その1、アンチセンスD041遺伝子を用いた方法）

(1) アンチセンスDAD1遺伝子導入ベクターの構築
pGEM-DAD1-HS を SpeI で切断し、切り出した 3651 bp の DNA断片を pBluescriptTM SK+ (Stratagene社) に連結して pBS-DAD1-SS を作製した。このアプラスミドを *E. coli* 変異型に、Clal 部位を導入したあるプライマー-DAD-p1(5'-GGATTCGATCGTGTCCACCTGCCTGGC-3') と BamHI 部位を導入したあるプライマー-DAD-p2(5'-CGCGATCGCTGCTCATATAGAGA-TGG-3') を用いてプロモーター領域をPCRによって増幅した。さらに、BamHI 部位を導入したある2個のプライマー-DAD-p1(5'-CGCGATCGCACACACTTTCTCAAC-3')と DAD-c2(5'-CGCGATCCACACACCGCTCTACC-3')を用いてDAD1翻訳領域部分をPCRによって増幅した。これらの増幅した断片を pBluescriptTM SK+ (Stratagene社) に挿入し、プロモーター配列の後ろにDAD1翻訳領域部分を逆向きに連結したアンチセンスDAD1遺伝子導入ベクターを作製した。

【0040】次に、アンチセンスDNA¹遺伝子をプラスミドベクターから切り出し、バイナリベクター-pAD1 (Drouchi et al. Nucleic Acids Res. 19: 6373-6378, 1991, 1. 1. 名古屋大学 町田泰利教授より供与) のCla IとSac Iの部位に挿入してバイナリプラスミドpADAD1 (図5) を作製した。

【0041】(2) シロイタナズナの形質転換
上記のバイナリープラスミドpMD1を *Agrobacterium tumefaciens* EH4101株に導入し、滅田正雄 (vacuum infiltration) 法によってシロイタナズナ (*Colubalia eschscholae*) に形質転換した。滅田正雄は植物遺伝育種学研究室 (東北大学大学院農学研究所) にシロイタナズナ (pp. 109-113.) に就けて行った。

【0042】形態に似たシロイタナズナは、dad1同株に開花後もその周囲が短くならず（図5左）、自殖種子を形成しなかった。形質転換体のまだ開花していない蕾を0.5mMジャスモン酸メチル水溶液に浸したところ、その後開花した花（図5右）のまな、花粉が萼の表面に露出した（図6）。また、この花粉を雄しべに受粉した結果、自殖種子の形成が認められた。このことから、実施例5-（1）に記述の遺伝子導入ベクターを導入することによって、dad1変換受変体と同様の雄性不妊性を示す形質転換植物を作出できることが明らかになった。

【0043】【実施例6】 雄性不妊植物の作出（その2、プロモーター-GUS遺伝子導入ベクターを用いた方

gatcccaat ttttcta taaagaac caatttctc tttcttcaa tcaatttaz 3360
 ttttcaacc aattactct tcaagactt aactactcc atttctata tacaacttt 3420
 ttaagaac ttgaattat cagaataat attataaat taaacaac aacactttc 3480
 tcaaca atg aga ttc tct ctt tct ccc gta cgt ccc cat agt gta gta 3528
 Met Arg Phe Ser Leu Ser Pro Val Arg Pro His Ser Val Val
 1 5 10
 gta cct tca cta cca aaa cag gac gtc gtt tct tat ata agt agt aag 3576
 Val Pro Ser Leu Pro Lys Gln Asp Val Val Ser Tyr Ile Ser Gly Thr
 15 20 25 30
 aag tgg aat cat caa tgt cga tgt gta ctt aca ctt cct tct cct tca 3624
 Thr Ser Asn Arg Gln Cys Arg Cys Val Leu Thr Leu Pro Ser Pro Ser
 35 40 45
 gtt tcc act tcc cga cca cgt gtt tta ccc aac cag gaa acc tgg gag 3672
 Val Ser Thr Ser Arg Pro Pro Val Leu Pro Lys Pro Gly Thr Trp Glu
 50 55 60
 agt ttg ctg cta aac cat gat caa att cca agc gaa ttc tca ccc act 3720
 Ser Leu Leu Leu Asn His Asp Gln Ile Pro Gly Glu Phe Ser Pro Thr
 65 70 75
 ggt tgg agt atc ccc gtt gtt ggt cgg aga tgg atg gag tat cag 3768
 Gly Ser Ser Ile Pro Val Lys Leu Gly Arg Arg Trp Met Glu Tyr Gln
 80 85 90
 ggg ctt caa aat tgg gac ggt ctt tta gac cca ttg gac gac aat ctc 3816
 Gly Leu Gln Asn Trp Asp Gly Leu Leu Asp Pro Leu Asp Asp Asn Leu
 95 100 105 110
 cgg cga gag att ctc cgg tac ggt caa ttt gtc gaa tgg gct tat caa 3864
 Arg Arg Glu Ile Leu Arg Tyr Gly Gln Phe Val Glu Ser Ala Tyr Gln
 115 120 125
 gca ttt gat ttc gat cct tcc tct cca acc tac ggg aca tgc cgg ttt 3912
 Ala Phe Asp Phe Asp Pro Ser Pro Thr Tyr Gly Thr Cys Arg Phe
 130 135 140
 ccg agg agc aag tta ggg cga tcc ggt tta ccc aac tcc ggt tat 3960
 Pro Arg Ser Thr Leu Leu Glu Arg Ser Gly Leu Pro Asn Ser Gly Tyr
 145 150 155
 cga cta aag aag aac ctt cgt gcc aag tca ggt att aac ttg cca cgt 4008
 Arg Leu Thr Lys Asn Leu Arg Ala Thr Ser Gly Ile Asn Leu Pro Arg
 160 165 170
 tgg att gag aag cga cca agc tgg atg gct aca caa tct agc tgg att 4056
 Trp Ile Glu Lys Ala Pro Ser Trp Met Ala Thr Gln Ser Ser Trp Ile
 175 180 185 190
 ggt tac atg gca gtt tgc cag gac aca gaa gag atc tgc cgg ctt ggg 4104
 Gly Tyr Val Val Ala Val Cys Gln Asp Lys Glu Glu Ile Ser Arg Leu Gly
 195 200 205
 cgt aga gac atc atc tcc ttc cgt gga acc gcc agc tgt ctc gag 4152
 Arg Arg Asp Val Val Ile Ser Phe Arg Gly Thr Ala Thr Cys Leu Glu
 210 215 220
 tgg tta gag aac ctc cgc gcc agc ctg act cat ctc cct aat ggg cct 4200
 Trp Leu Glu Asn Leu Arg Ala Thr Leu Thr His Leu Pro Asn Gly Pro
 225 230 235

act gga gca aat cta aac ggg tct aac tct ggg ccc atg gtt gag agc 4248
 Thr Gly Ala Asn Leu Asn Gly Ser Asn Ser Gly Pro Met Val Glu Ser
 240 245 250
 ggg ttt tta agc ttg tat act tca ggt gtt cac agt ttg aga gac atg 4296
 Gly Phe Leu Ser Leu Tyr Thr Ser Gly Val His Ser Leu Arg Asp Met
 255 260 265 270
 gta aga gaa gag atc gca agg cta ctc caa tct tac ggc gac gag cgg 4344
 Val Arg Glu Glu Ile Ala Arg Leu Leu Gln Ser Tyr Gly Asp Glu Pro
 275 280 285
 tta agt gta aag ata acc ggt cac agc ctc ggc gct ggc atc ggc aca 4392
 Leu Ser Val Thr Ile Thr Gly His Ser Leu Gly Ala Ala Ile Ala Thr
 290 295 300
 cta gca gct tac gat atc aaa acg acg ttt aaa cgt ggc cct atg gtt 4440
 Leu Ala Ala Tyr Asp Ile Lys Thr Thr Phe Lys Arg Ala Pro Met Val
 305 310 315
 acc gta ata tct ttc gga ggt cca cgt gtc gga aac aga tgc ttt cgg 4488
 Thr Val Ile Ser Phe Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Arg Cys Phe Arg
 320 325 330
 aaa ctc ctt gag aag caa ggc acg aag gtt cta atc atc gtc aac tcc 4536
 Lys Leu Leu Glu Lys Gln Gly Thr Lys Val Leu Arg Ile Val Asn Ser
 335 340 345 350
 gag gac gtc atc acc aaa gtt cct gga gtt tta gaa aac aga gag 4584
 Asp Asp Val Ile Thr Lys Val Pro Gly Val Val Leu Glu Asn Arg Glu
 355 360 365
 caa gat aac gtt aag atg aca ggc tgc ata atg ccc agc tgg ala cag 4632
 Gln Asp Asn Val Lys Met Thr Ala Ser Ile Met Pro Ser Trp Ile Gln
 370 375 380
 aga cgc gtc gag gag acg cgg tgg gtt tac gct gaa atc ggt aag gag 4680
 Arg Arg Val Glu Glu Thr Pro Trp Val Tyr Ala Glu Ile Gly Lys Glu
 385 390 395
 ctt cgg ctg agt agc cgt gac tgc ccc ccc ttg agc agc atc aat gtc 4728
 Leu Arg Leu Ser Ser Arg Asp Ser Pro His Leu Ser Ile Asn Val
 400 405 410
 gcc acg tgt cat gag ctg aca acg tat tta cat ttg gta gac ggg ttt 4776
 Ala Thr Cys His Glu Leu Lys Thr Tyr Leu His Leu Val Asp Gly Phe
 415 420 425 430
 gtc agc tcc acg tgt cca ttc aga gaa aca gct cgg aga gtt ctc cat 4824
 Val Ser Ser Thr Cys Pro Phe Arg Glu Thr Ala Arg Arg Val Leu His
 435 440 445
 aga tgaattca ttgactgac attgtaact aatttaatt ttgcaaga 4877
 Arg
 aactaanaac cagaagaaa atcaagacc gcgtacgggt ttgattcggt tacaanaa 4937
 atttctgac atactctaa cttagcggtt gaattagaaa agaaagtaaa gtagaaga 4997
 gccttaagg gcgaanaat aanaatgtat tgaagctgt ataatctcaa attgttata 5057
 tactgtatag tttttttaa aanaattgcc gtaattatg aanaatggt cataaat 5117
 aanaattgt cgcacagca tggctacta aaactctaa agcgtaaat tgcitaaat 5177
 tggacagaa aggaagtag aagcaaaaa tctctctat tccgtcaaa tatagaana 5237
 ggaatgcc caatgaggt gccagtag caccagct tgaagaagt tgaatgac 5297
 tctgtactg gcaaaaagc ttaaaagatt cagttggtt caaatctga atgccaalg 5357
 agaaacaga tcatgccc tcaatttatt taccgtatg tatttattt cctgttacc 5417

aggaanaalc accatacaag cgtatttttg tgggtgtc atgtctgtgt tgtttttaa 5477
 ctctccaa aagttgttt tatgtacg tactactaag aaagaccata aantaagc 5537
 caanaagtg gatatatgt tctgtgata atgtttatt ctatgtatua tanaagcaa 5597
 actagtgc acttcatgt gataatlat aaagtataa tttgtatua taaataga 5657
 tatttcaaa taattatlat atttlatat gtatgtaaa cataataca tgttcatg 5717
 gctagaga aataacattt taltcatgtt tgtatatac ttaagtata aacatctc 5777
 acttaagct atctatatac tattatttt tattttataa tattgtttt ttaatttaa 5837
 ahaanaatt cagacatga tatatacta aataatcct taaaacac ahaanaatt 5897
 catcaagag gaaggtataa taatagaaga tctttttgt tttgtgttg gttaaatata 5957
 tgcagact taagcatatg attatagt catgaant agatlatgt ttaattttt 6017
 catatagtg ttctttttt tctaaaag aaaccattia actgaaggt gacgaac 6077
 ggtcagcat actgttttt cagtcatgt aaaggagaa tatatcat gaaagatc 6137
 aagcglata cglacalata caggacgc gtatctcaa atatatgc acaaaatga 6197
 atagatgca taccgacca taccnaat cgtacttg aactatata tagtttaga 6257
 aagtaacat catgtatc atctttgt actttgtag accacacca ttctctgc 6317
 aanaatcat caaatgga gacgcaca tattttgat tattaagtt atattgaag 6377
 gttttatt ttcttttgc gtacattct ctctgttt ctctatgat ttaagtaga 6437
 ttaagaggt caataagta tgaattaac ctcttcatt tccgttaatt tggaaact 6497
 cagtttgat acatctgc accattttt agtataatt aacaaaaa gaactttga 6557
 aaactaatt tatcgtgtg actttttg ttegttg catittttt caacatgt 6617
 caaaagtt accatgaac atattatgt atttagatt agtatattt tacaatatg 6677
 tgcacgata cgtacatata ctggacct taaggtgac agtatgga tataggaat 6737
 caggacct ttacaaaa aanaaaag aaaaaaaa gaatacag accatctaa 6797
 aactattgt tctctatc ataatgttt atactataa ttaagttaa aagtaaat 6857
 tatagtatt aanaagta gtctacag abataacag aaatatttt aagtaacaa 6917
 tttaguca taatctaa agtttttaa atactatga tttaataca aaactttat 6977
 ahaatttt gatagct ttacgata abataagat catgatcca aattgtatt 7037
 atttttacc gtaattggt gaagtaagt attcttga taaatttcc taagttaat 7097
 tttaaggt talgaagat agatataat tctcataaa acttttata atgtattat 7157
 aagatatitt tctaaaag acaagtaat tactttgtc gtacacaa aactaactia 7217
 cgttgatca actgtatc tacaaggt atacattatt aatttatcat tacaanaatt 7277
 ggaagaggt tacttaaca aticaanaat atatagaat ccaaaagat ttatcaact 7337
 ctitttaatt taagtttta cgtgaatcat ggalatlat calatgata caagtgtat 7397
 ctgaagatt ttacgcagat ttgaacag gacaaaca gctacgcca tggagacc 7457
 agcaaatag atattttat abataaatt ggaattttt gacgaatg aaacgaag 7517
 tgaacagaa gattaatc ataatcttt ctattataa atttaacta ttctttcta 7577
 attcatbac aattttga catcagaca atgttaacti atgtactat aagacaatg 7637
 taatctata atagatttt ttittttgaa atcgcata tatatgaa ttaataaga 7697
 catatgatg catttgac ataatataa aataataa tttagcaaa taataagta 7757
 atgaagag agagaatgt atgtatgtg gtgggttg atgtttat gctctcta 7817
 tctcaacti gacaaattt gcgtgtcc acaacacc caaagaa ttatcaaaa 7877
 ttataaat caatgaagt cctatctct ctacccaac tctacttc atttcaact 7937
 catgaact tttagtcaa ttaatttct atacttata alatatatt taaatgaatt 7997
 ttgaagac tgtgtgtc ataaataa tgcgtgtac tattaagat caaataga 8057
 atgtacttt taactcaaa ttaatttaca acatltaga ttatgtatt tttttttt 8117
 caagcttca cgtacg 8133

<210>: 2
 <211>: 447
 <212>: PRT
 <213>: Arabidopsis thaliana
 <400>: 2
 Met Arg Phe Ser Leu Ser Pro Val Arg Pro His Ser Val Val Val Pro
 1 5 10 15
 Ser Leu Pro Lys Gln Asp Val Val Ser Tyr Ile Ser Gly Thr Thr Ser
 20 25 30
 Asn Arg Gln Cys Arg Cys Val Leu Thr Leu Pro Ser Pro Ser Val Ser
 35 40 45
 Thr Ser Arg Pro Pro Val Leu Pro Lys Pro Glu Thr Trp Glu Ser Leu
 50 55 60
 Leu Leu Asn His Asp Gln Ile Pro Gly Glu Phe Ser Pro Thr Gly Ser
 65 70 75 80
 Ser Ile Pro Val Lys Leu Gly Arg Arg Trp Met Glu Tyr Gln Gly Leu
 85 90 95
 Gln Asn Trp Asp Gly Leu Leu Asp Pro Leu Asp Asn Leu Arg Arg
 100 105 110
 Glu Ile Leu Arg Tyr Gly Gln Phe Val Glu Ser Ala Tyr Gln Ala Phe
 115 120 125
 Asp Phe Asp Pro Ser Ser Pro Thr Tyr Gly Thr Cys Arg Phe Pro Arg
 130 135 140
 Ser Thr Leu Leu Glu Arg Ser Gly Leu Pro Asn Ser Gly Tyr Arg Leu
 145 150 155 160
 Thr Lys Asn Leu Arg Ala Thr Ser Gly Ile Asn Leu Pro Arg Trp Ile
 165 170 175
 Glu Lys Ala Pro Ser Trp Met Ala Thr Gln Ser Ser Trp Ile Gly Tyr
 180 185 190
 Val Ala Val Cys Gln Asp Lys Glu Glu Ile Ser Arg Leu Gly Arg Arg
 195 200 205
 Asp Val Val Ile Ser Phe Arg Gly Thr Ala Thr Cys Leu Glu Trp Leu
 210 215 220
 Glu Asn Leu Arg Ala Thr Leu Thr His Leu Pro Asn Gly Pro Thr Gly
 225 230 235
 Ala Asn Leu Asn Gly Ser Asn Ser Gly Pro Met Val Glu Ser Gly Phe
 240 245 250 255
 Leu Ser Leu Tyr Thr Ser Gly Val His Ser Leu Arg Asp Met Val Arg
 260 265 270
 Glu Glu Ile Ala Arg Leu Leu Gln Ser Tyr Gly Asp Glu Pro Leu Ser
 275 280 285
 Val Thr Ile Thr Gly His Ser Leu Leu Gly Ala Ile Ala Thr Leu Ala
 290 295 300
 Ala Tyr Asp Ile Lys Thr Thr Phe Lys Arg Ala Pro Met Val Thr Val
 305 310 315 320
 Ile Ser Phe Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Arg Cys Phe Arg Lys Leu
 325 330 335
 Leu Glu Lys Gln Gly Thr Lys Val Leu Arg Ile Val Asn Ser Asp Asp
 340 345 350

Val Ile Thr Lys Val Pro Gly Val Val Leu Glu Asn Arg Glu Gln Asp
355 360
Asn Val Lys Met Thr Ala Ser Ile Met Pro Ser Trp Ile Gln Arg Arg
370 375 380
Val Glu Thr Thr Pro Trp Val Tyr Ala Glu Ile Gly Lys Glu Leu Arg
385 390 395 400
Leu Ser Ser Arg Asp Ser Pro His Leu Ser Ile Asn Val Ala Thr
405 410 415

Cys His Glu Lys Lys Thr Tyr Leu His Leu Val Asp Gly Phe Val Ser
420 425 430
Ser Thr Cys Pro Phe Arg Glu Thr Ala Arg Arg Val Leu His Arg
435 440 445

<210>: 3
<211>: 3422
<212>: DNA
<213>: Arabidopsis thaliana
<220>:
<221>: promoter
<222>: (1) .. (3422)
<400>: 3

aagctcttt attaccact taagtaata tccaacaa ttccatttg catgaact 60
taagtaact attccttaa ttaattaca caaattga gtagttagt 120
tgaacttt attcctct agattatc ttaagata accttggt tgaatait 180
cgttagag cgttgaga tatattc attcttalc agaccatga gtacatct 240
ttccacat ccttagaa caatttagt atgaataa acacatcga aataactg 300
tattagat agaaaat taaaat tatgtcat cacagattt gaaaatat 360
aatcalt aatcaltg atagcga tatatag cacattatg ttaattga 420
caactgtt aaatagt ttgttga tatctata acatagaa aaatgata 480
ttatgtt gaataac tatattat tatataga ccatatca aataatga 540
tagtaagt atgaacac atagatc caaagaag ttgttagtg gctctgat 600
gttaacgc tagttaga cttatcga ctgcacga tactttagc ttcttagt 660
cacttttt ttttttaa caaataag aaatagtc ttaagaaga ctctatgt 720
agctaac atactatt tcaattggt tatatag atgataaa ctatagat 780
aaatagtc gaatcagc taacacag ggaatagc agtaataa gtataatt 840
ttctaac cttatcga gaagtaga tttgtttt ttgtcag tgaattgt 900
ttatattg aaattatt aatgata actataat atagttaa gtagaatt 960
ctcttttc cttttttt tttttaa atgttagctt aagtataa gtttttag 1020
taataaatt ttgttagt atagaat cgttagtaga actatact aagtataa 1080
gaacatga aataaat tcaatga gttatga ttgttagc gtagtaga 1140
taccataat atattagt aaagatct actaacga gaccacgc aaagtact 1200
atatattt cactcga actaaact ttcttaca tgaatctc aactttgt 1260
cgttactt tacaactt aatataa gactcgtt agttcttac aaaaatca 1320
catcaca agtttagt atgtatca ctctctct ctctgttc cttcttaa 1380
attactct taattttt ttgttaga aagaat actttant gtttttag 1440
aacatgaa caaagtc gaaaga aagcaat gtaagata ttgaatag 1500
ccatcaga aaagatga aagaata catataag aacatata ttgctttgt 1560
ggttagt attgttcc caatatag aatgcacg ttgttagt atatcaaa 1620
catcatt taatcgag aatgtag aatcagct catataat agtttaga 1680
ttgttagc aattttgt tatcaaa caagaatt gtccatc gatgaga 1740

ccaaactc ttaattgt aagcattg atgtattc taagaagc attttcag 1800
cttccatg gctctc ctagtatc atgtttatc gtaaat aactcttt 1860
cttcaatg gttatagc tacaattc tttttactc atatacata taattctg 1920
taagatac agaatcaa agttttta ttactagt ccaagtgag taactttg 1980
aatgcattc aagatgaa taatgaa tcttaaaag tatataag taacaactc 2040
tttcaaat cactaggt atcaataa tataaana atattgaaa aagctaga 2100
ctctaaag attataat gaaagaagc tatagtat taagaagc aagactaa 2160
tataaagc taccatgt gattgaat tcaataga agtaactc gttcattc 2220
ttttatgt cgtttgcc gaacaca taccacac ttattatt gactttac 2280
tgttaccg gataggt agaatata atttaccg gactttat actttgac 2340
tttgccta ttcaatgat taattacc atttctgt catttgata tgatatta 2400
cactacat ttattatg atttaagc gatacat tttaagat ttatagtt 2460
ctttatag tagatata acttggtt aattgata aaacatag ctgaagct 2520
agaagcgt ggaatag gagtgata ctctactt tcttgaga tcaaatc 2580
gaattgag ggaatag aagcgaag gtaacac cagcagat gagcagtc 2640
gaatgaga tagttcca cgttcaag ctttttag cgtatgt tgaacatc 2700
cagtgaca gttccatg aagcagct cagatata ttctgata cacttttc 2760
ttctcata tcatcagc cgtcattc tcttagtc attatcat atttactt 2820
tttttttt ttgttacc aattcatt aacttttt ttittgaaa taaagcac 2880
atanaag agatgaaa cgtatgta aaacacac taataagta gactcatt 2940
atgaccaa atattgtt cactgtt ttatgcca ttgttaga gtaagaag 3000
gaagaaca actatgta ttgttacc atactatt atattagt gaaattgt 3060
caagattg actatttt catagata aatacaaa ccaagattt gtagtttc 3120
taattgta catattag tttagatc agaaacta ctgaatcc taacacaa 3180
aagcagtc aatgata ttgttatt agataaat tcatattt atataagc 3240
tgtcaaat tttagatc gacttttc attttaca actttttta ctctcata 3300
gactcaat ttctcata taaagaac cacttctc ttcttcaa tctttatc 3360
ttcttacc aactatct tcaagctc aactactc atttctata tacaactt 3420
tt

【図面の簡単な説明】

【図1】T-DNAタギングに使用した遺伝子導入ベクターの図。

【図2】野生型 (WS) およびdad1突然変異体の花および葯の形態を示す写真。

【図3】DAD1遺伝子クローニングの概要を示す図。

【図4】相補性実験に用いた遺伝子導入ベクターの構造を示す図。

【図5】アンチセンスDAD1遺伝子植物導入ベクターの構造を示す図。

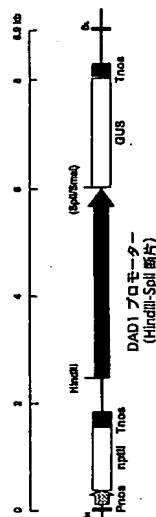
【図6】アンチセンスDAD1を形質転換したシロイヌナズナの花および葯の形態を示す写真。

【図7】プロモーター-GUS遺伝子導入ベクターの構造を示す図。

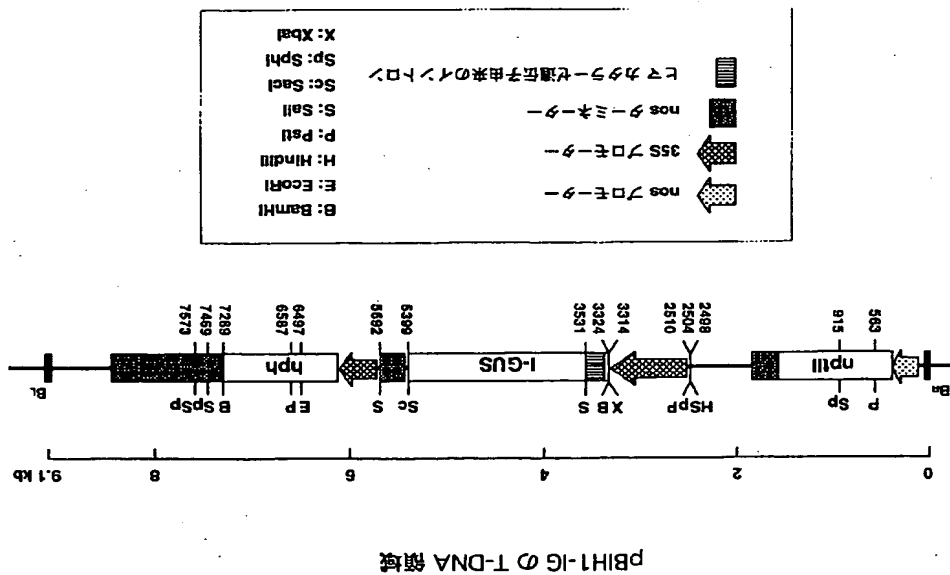
【図8】DAD1遺伝子をプロンプにしたサザンハイブリダイゼーションの結果を示す図。

【図7】

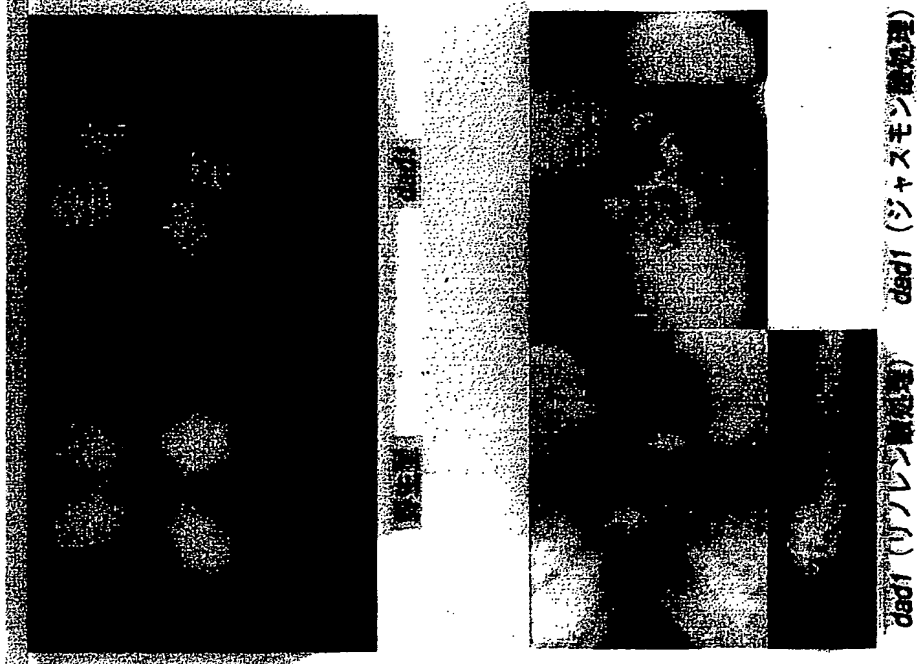
pDAD1-HのT-DNA 構造



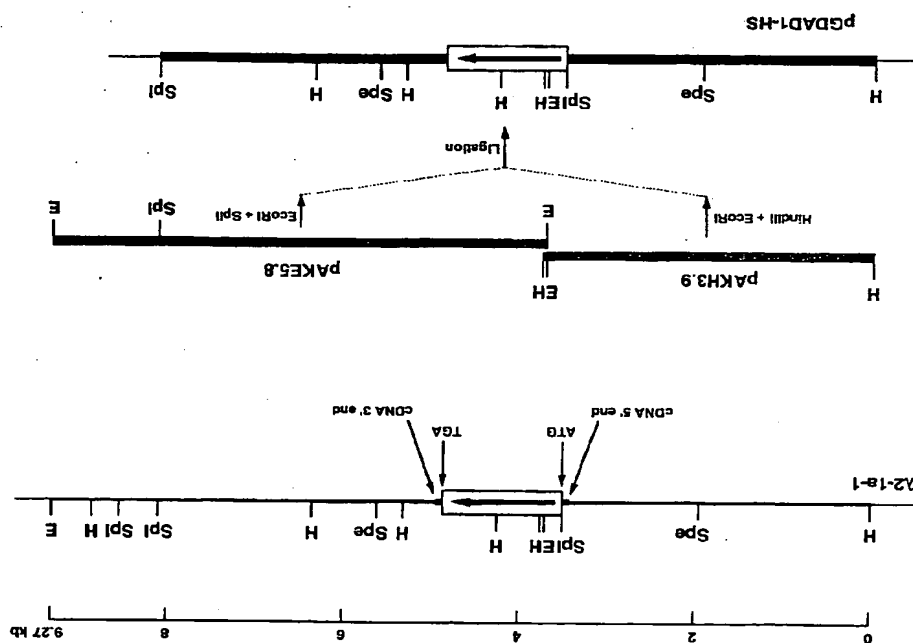
【図5】



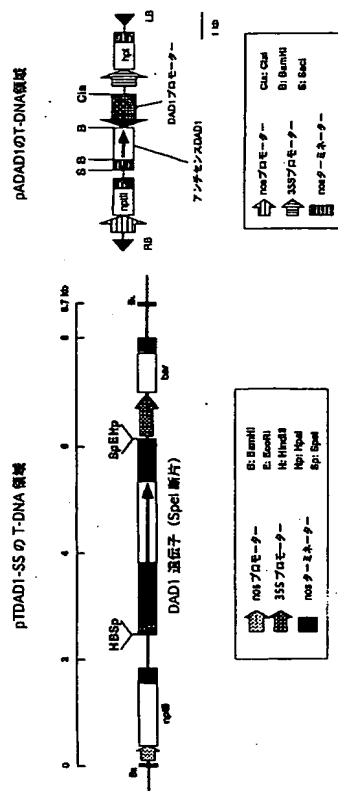
【図6】



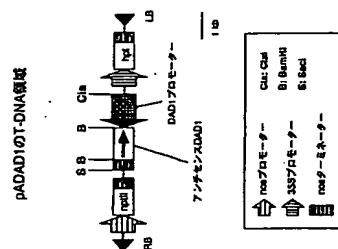
【图3】



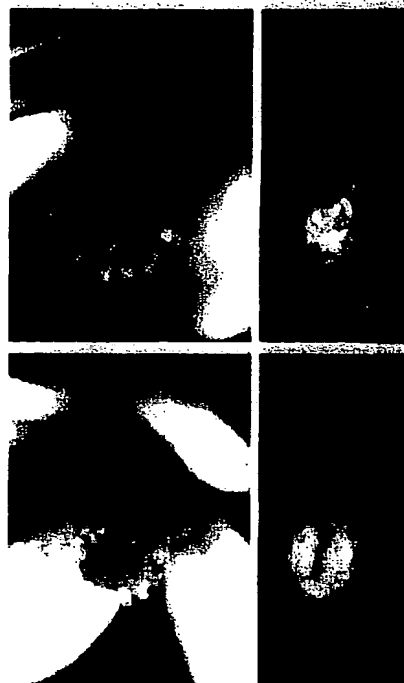
【図4】



【例5】

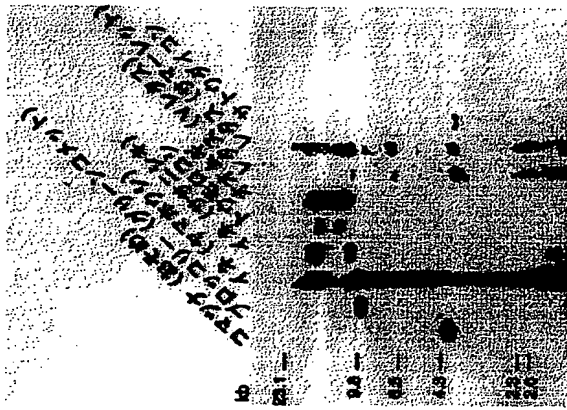


【図6】



アンヂセンズ 林分 責任子を導入した個体
アンヂセンズ 幼若 責任子を導入した個体
(ジヤスモン酸誘導)

【図8】



(72)発明者 小田 明子

Fターム(参考) 28030 AA02 AB03 AD20 CA07 CA08
CA17 CA19 CB02 CD06 CD13
CD14 CD17 CD01 HA01
4B024 AA08 BA80 CA04 EA04
4B065 AA88X AA88Y AB01 BA16
CA24 CA53

愛知県岡崎市明大寺町字西郷中38番地 岡
崎国立共同研究機構基礎生物学研究所

【手続補正書】	【手続補正2】
【提出日】平成12年6月16日(2000.6.16)	【補正対象書類名】明細書
6)	【補正対象項目名】請求項2
【手続補正1】	【補正方法】変更
【補正対象書類名】明細書	【補正内容】
【補正対象項目名】請求項1	【請求項2】以下の(a)又は(b)に示すDNA
【補正方法】変更	(a)配列番号2に記載のアミノ酸配列により表されるタンパク質をコードするDNA
【補正内容】	(b)配列番号2に記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列により表され、薬の発現を制御する機能を有するタンパク質をコードするDNAであって、(a)のDNAに、部位特異的変異誘発法によって変異を生じさせることにより得ることのできるDNA
【請求項1】以下の(a)又は(b)に示すDNA	
(a)配列番号3に記載の塩基配列により表されるDNA	
(b)配列番号3に記載の塩基配列において1もしくは複数の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列により表され、プロモーター活性を有するDNAであって、(a)のDNAに、部位特異的変異誘発法によって変異を生じさせることにより得ることのできるDNA	

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷
C12R 1:91)

F1

ターム(参考)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.